

Effecten van nitriet op groei en voederbenutting van aal

A. Kamstra¹, J.A. Span² en J.H. van Weerd¹

1: DLO-Rijksinstituut voor Visserijonderzoek, IJmuiden

2: Vakgroep Visteelt en Visserij, LU Wageningen

Eén van de onderwerpen waar het visteelt-onderzoek op het RIVO-DLO zich momenteel mee bezig houdt, betreft de relatie tussen waterkwaliteit en groei en voederbenutting van aal (*Anguilla anguilla*). In het kader van dit onderzoek heeft John Span een doctoraal-onderwerp op het RIVO uitgevoerd, waarvan hier de belangrijkste resultaten worden weergegeven.

Om recirculatiesystemen te kunnen ontwerpen en te 'managen', is het noodzakelijk inzicht te hebben in de waterkwaliteit die in een dergelijk systeem nagestreefd dient te worden. Van een aantal parameters zoals zuurstof, ammonium, pH en temperatuur is in grote lijnen bekend welke waarden nodig zijn om bepaalde vissoorten maximaal te laten groeien. Van veel andere stoffen en combinaties van stoffen is weinig bekend over de effecten van langdurige blootstelling aan sub-lethale concentraties. Daarnaast zijn er vele stoffen waarvan de concentratie nooit bepaald wordt in recirculatiewater, maar die bij bepaalde concentraties schadelijk zouden kunnen zijn. Men kan daarbij denken aan andere uitscheidingsproducten van de vis dan ammonium, afbraakproducten van de biologische zuivering of stoffen, direct afkomstig uit het voer.

Nitriet is zo'n stof waarvan we weten dat het in principe giftig is voor vissen, maar waarvan weinig bekend is wat betreft effecten van langdurige blootstelling. Nitriet kan tijdens het opstarten van biologische filters in concentraties van 20 tot 30 mg NO₂-N/l* voorkomen. Bij normale bedrijfsvoering liggen de concentra-

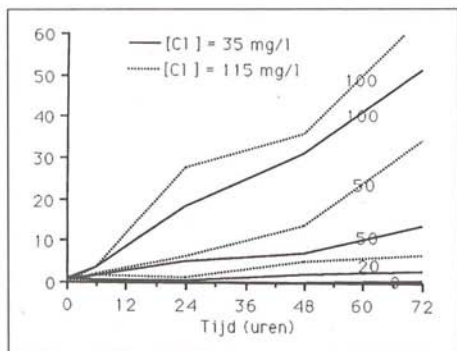
ties in palingkwekerijen in de orde van 0.1 tot 3 mg NO₂-N/l. Hoewel de praktijk van het palingkweken en onderzoek van Saroglia et al. (1981) leren dat Europese aal niet erg gevoelig is voor nitriet, blijkt uit Japans onderzoek dat nitriet bij Japanse aal (*A. japonica*) problematisch kan zijn (Amano et al, 1981; Kubota et al, 1981). Sommige kwekers verklaren dat alen soms negatief reageren op reeds enkele mg/l nitriet in het teeltwater. Dit is reden genoeg om te onderzoeken in hoeverre bij Europese aal effecten van nitriet op groei en voederbenutting waargenomen kunnen worden.

Voordat we het eigenlijke experiment gaan bespreken, eerst enige achtergrond over de toxiciteit van nitriet.

* De nitriet-concentraties zijn uitgedrukt op stikstofbasis (NO₂-N). Deze getallen dient men met 3.33 te vermenigvuldigen om ze naar NO₂ om te zetten.

Toxisch mechanisme

De meeste vissoorten die met nitriet in hun omgeving worden geconfronteerd, concentreren deze stof in het bloed. Dit wordt veroor-



♦ **Figuur 1:** Het verloop van de concentratie nitriet in het bloedplasma van 'wilde' aal bij continue blootstelling aan een vijftal nitriet-concentraties (de getallen in de grafiek) bij twee chloride-gehaltenes.

zaakt door het feit dat de chloride-cellen in het kieuwweefsel, die bij zoetwatervissen verantwoordelijk zijn voor de opname van chloride uit het milieu, geen onderscheid kunnen maken tussen nitriet en chloride. Dit verklaart ook waarom een hoge chloride-concentratie in het water (bijvoorbeeld uit keuzenzout) de vis kan beschermen tegen nitriet. Een deel van de nitriet-opname verloopt mogelijk passief en is afhankelijk van het pH-verschil tussen water en bloed.

Tussen vissoorten bestaan grote verschillen in de gevoeligheid voor nitriet, die vallen te verklaren uit de mate waarin chloride vanuit het milieu wordt opgenomen. Zo heeft bijvoorbeeld regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*) een 96 uur LC-50* van minder dan 1 mg/l, terwijl bij 'largemouth bass' (*Micropterus salmoides*) een 96 uur LC-50 van 137 mg/l NO₂-N gemeten is (Tomasso, 1986).

Het opgenomen nitriet dringt de rode bloedcel binnen, waar het haemoglobine (Hb) omzet in methaemoglobine (metHb). Haemoglobine is een eiwit dat verantwoordelijk is voor het transport van zuurstof in bloed; metHb is niet in staat om zuurstof te binden. Het bloed van vissen met een hoog percentage metHb heeft

een typisch bruine kleur. Het zal duidelijk zijn dat vissen met een hoog percentage metHb weinig zuurstof kunnen opnemen voor metabolische activiteiten zoals voortbeweging of groei. Overigens zijn vissen (in tegenstelling tot zoogdieren) wel in staat om hoge percentages metHb te overleven, zolang ze met rust worden gelaten. Van nature kan er reeds 10 tot 20% metHb in vissebloed aanwezig zijn, terwijl er enzymssystemen aanwezig zijn om metHb te reduceren tot Hb.

De toxische werking van nitriet berust, naast vorming van metHb, waarschijnlijk ook op andere factoren zoals beschadiging van de lever (Ariello et al, 1984).

* 96 uur LC-50: de concentratie waarbij 50% van de proefdieren na 96 uur gestorven is.

Opzet

In een eerste experiment is onderzocht in welke mate aal nitriet uit het water opneemt en vorming van metHb optreedt. Hiertoe werden groepen van circa 50 aalen met een gemiddeld gewicht van 67 gram gedurende 72 uur aan een viertal nitriet-concentraties blootgesteld (0, 20, 50 en 100 mg NO₂-N/l). Aan het begin en na 6, 24, 48 en 72 uur werd van 10 dieren per groep bloed verzameld, waarin nitriet, Hb en metHb werd bepaald. Omdat de uitkomsten van een dergelijk experiment mogelijk beïnvloed worden door blootstelling van de aal aan nitriet in het verleden, zijn 'wilde aalen' en 'kweekaalen' vergeleken.

Zoals we zagen, is het chloride-gehalte van het water een belangrijke factor voor de opname van nitriet. Er is daarom tevens een vergelijking uitgevoerd tussen gewoon leidingwater en water waarvan het chloride-gehalte kunstmatig is verlaagd door menging met gedemineraliseerd water. In totaal is er dan sprake van 16 groepen (4 concentraties nitriet, 2 groepen aal en 2 chloride-gehaltenes).

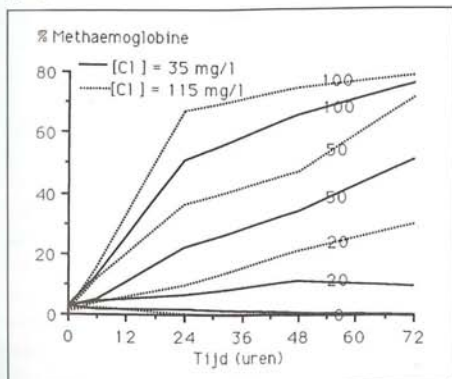
Voederproef met aal

Wanneer we de sub-lethale effecten van nitriet onderzoeken, dan zijn we met name

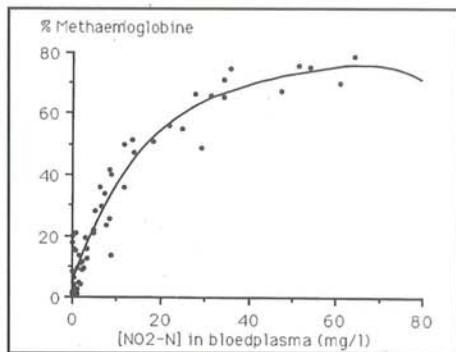
geïnteresseerd in effecten op groei en voederbenutting. Enerzijds kan de maximale groei beperkt worden door een verminderde voeropname, bijvoorbeeld door een beperking van de zuurstoftransportcapaciteit van het bloed (metHb). Anderzijds kan men zich voorstellen dat bij blootstelling aan nitriet het onderhoudsmetabolisme wordt verhoogd, door bijvoorbeeld verhoging van de kosten die gemaakt moeten worden om metHb te reduceren.

Dit laatste zou dan resulteren in een verminderde voederbenutting. Om onderscheid te kunnen maken tussen deze twee factoren is een deel van de vissen tot verzadiging en een deel gerestricteerd gevoerd.

Het experiment is uitgevoerd in een vijftal onafhankelijke recirculatiesystemen waar concentraties nitriet werden aangelegd van 0, 1, 5, 10 en 20 mg NO₂-N/l. Op ieder systeem waren vier aquaria van 40 liter aangesloten, die vanuit een centrale pompbak van water werden voorzien. Het water in de systemen werd continu ververst met leidingwater (circa 2 m³ per dag) om het ammonium-gehalte binnen de perken te houden. Met een doseerpomp werd vanuit een geconcentreerde stock-oplossing continu nitriet (NaNO₂) gedoseerd om het uitgespoelde nitriet aan te vullen.



♦ **Figuur 2:** Het verloop van het percentage metHb in het bloed van 'wilde' aal bij continue blootstelling aan een vijftal nitriet-concentraties (de getallen in de grafiek) bij twee chloride-gehaltes.

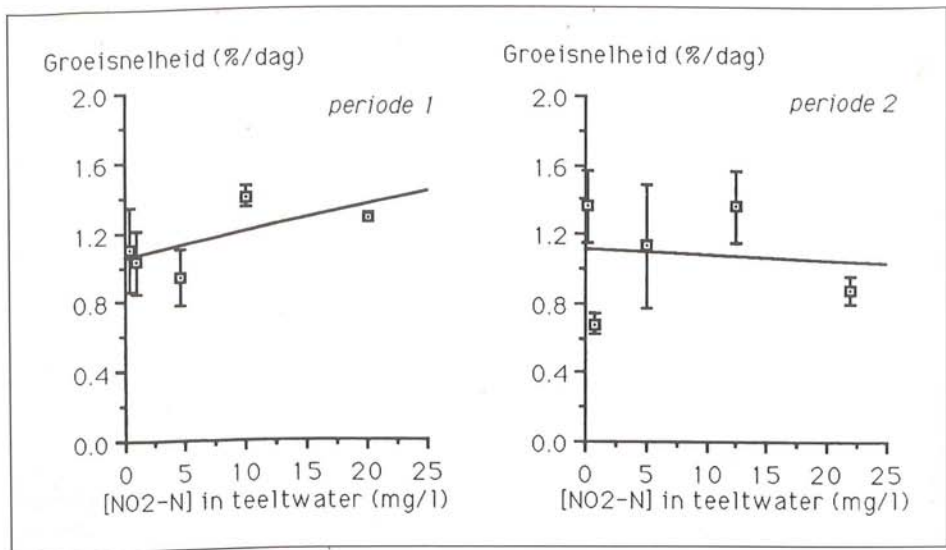


♦ **Figuur 3:** Het verband tussen het nitriet-gehalte van het bloedplasma en het percentage metHb ('wilde aal' en 'kweekaal').

Het experiment bestond uit een adaptatieperiode van 27 dagen en twee proefperiodes van 25 dagen (periode 1 en 2). De aquaria werden bezet met circa twee kg aal met een gemiddeld gewicht van 24 gram. Aan het begin en eind van de proefperiodes zijn de vissen gewogen en is bloed verzameld voor bepaling van nitriet en metHb.

Resultaten

In figuur 1 wordt het verloop van de nitriet-concentratie en in figuur 2 het percentage metHb in het bloed weergegeven. Hoewel de concentratie nitriet sterk toeneemt, blijven de waarden in het bloed beneden die van het omringende water. Het verloop van het percentage metHb is sterk gerelateerd aan de concentratie NO₂-N in het bloed (figuur 3). Het chloridegehalte van het water blijkt een significant effect te hebben op de opname van nitriet en de vorming van metHb. In tegenstelling tot wat op grond van de theorie verwacht mag worden, is de opname het hoogst bij het hoogste chloridegehalte. Echter in het onverdunde water met het relatief hoge chloridegehalte, is de pH ook relatief hoog. In de literatuur zijn effecten van de pH op de opname van nitriet beschreven die mogelijk een verklaring voor de waargenomen verschijnselen vormen. Het percentage metHb bereikt een plateau



◆ **Figuur 4:** Het verband tussen de nitriet-concentratie en de specifieke groeisnelheid voor de ad lib gevoerde groepen. Weergegeven is het gemiddelde \pm de standaard-afwijking.

van circa 80 procent bij een nitriet-concentratie in het plasma van ± 60 mg N/l. Bij een externe concentratie van 20 mg NO₂-N/l wordt bij het lage chloride-gehalte na 48 uur reeds een evenwicht bereikt voor zowel nitriet als met-Hb.

De sterfte was bij alle concentraties nihil. De herkomst van de vissen ('wild' of 'kweek') bleek geen significant effect op de uitkomsten te hebben. Blijkbaar is eerdere blootstelling van kweekaal aan nitriet niet van belang voor de opname in een later stadium.

Een aantal overgebleven vissen uit de groep, die is blootgesteld aan 100 mg NO₂-N/l, zijn na 72 uur aangehouden bij een zelfde nitriet-concentratie. Na 12 dagen was 85 procent van de ingezette vis dood.

De relatief geringe opname van nitriet in dit experiment kan verklaard worden uit het feit dat aal weinig chloride via de kieuwen uit het milieu opneemt (Kirsch, 1972). De noodzaak hiertoe ontbreekt omdat alen zeer efficiënt chloride kunnen achterhouden in de nieren.

Voederproef

Aan het begin en eind van de proefperiodes zijn bloedmonsters verzameld waarin nitriet en metHb zijn bepaald. Aan het eind van de adaptatieperiode (begin eerste proefperiode) werden in alle groepen nitriet-concentraties in het bloedplasma gemeten, variërend van 0.1 tot 2.7 mg/l en metHb percentages van 2 tot 4 procent. Aan het eind van periode 1 werd slechts bij één behandeling nitriet in het bloed gemeten (0.25 mg/l) en varieerde het metHb-gehalte van 0.2 tot 3 procent. Aan het eind van periode 2 werd geen nitriet in het bloedplasma aangetroffen. Deze resultaten verschillen sterk van de waarnemingen in het eerder beschreven experiment. Bij blootstelling gedurende 72 uur aan 20 mg/l NO₂-N in leidingwater, werd een nitrietgehalte in het bloedplasma van 5 mg/l bereikt bij een metHb-gehalte van 20 à 27 procent. Blijkbaar is aal in staat om bij langdurige blootstelling aan nitriet, deze stof effectief uit het lichaam te weren. De percentages metHb die tijdens de voederproef zijn

gemeten, zijn daardoor laag en kunnen als een achtergrondniveau worden beschouwd. Het mechanisme dat hieraan ten grondslag ligt, is onbekend. Opvallend zijn de waarnemingen van Amano et al. (1981) bij Japanse aal. Bij blootstelling gedurende een maand aan een concentratie van 20 mg/l $\text{NO}_2\text{-N}$ trad een gemiddeld gehalte aan metHb op van 24 procent. De omstandigheden waaronder dit experiment is uitgevoerd (chloride concentratie in het water) zijn echter zeer summier beschreven.

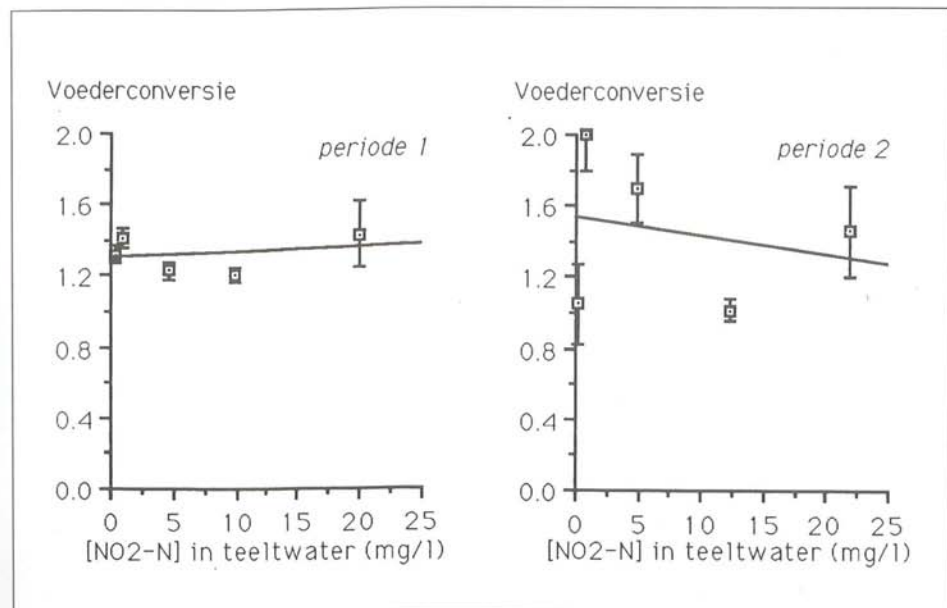
In figuur 4 is voor de twee perioden afzonderlijk het verband weergegeven tussen de gerealiseerde nitriet-concentratie in de systemen en de specifieke groeisnelheid van de ad lib gevoerde groepen. De verschillen tussen groepen, blootgesteld aan diverse concentraties nitriet, zijn aanzienlijk. Er is echter geen significant negatief verband tussen de concentratie nitriet en de groeisnelheid. Ook bij conti-

nue blootstelling aan 20 mg $\text{NO}_2\text{-N/l}$ blijken goede groeicijfers mogelijk te zijn.

De sporadische waarnemingen die er op zouden wijzen dat nitriet in Nederlandse palingkwekerijen soms voor problemen zorgt, hebben waarschijnlijk een andere oorzaak. Verhoogde nitriet-concentraties kunnen soms veroorzaakt worden door vervuiling in het systeem of niet optimaal functionerende filters. In dergelijke situaties is het waarschijnlijk dat ook andere stoffen met negatieve effecten op aal worden geproduceerd.

Effecten van nitriet op voederbenutting zijn bestudeerd bij geresliceerd gevoerde groepen (0.9 procent/dag) om de invloed van voerverspilling en voederniveau op voederbenutting uit te schakelen. In figuur 5 zijn de resultaten voor wat betreft de voederconversie weergegeven.

Met name in periode twee zijn er aanzienlijke verschillen tussen de experimentele behandelingen. Ook hier is echter geen significant ver-



♦ **Figuur 5:** Het verband tussen de nitriet-concentratie en de voederconversie voor de geresliceerd gevoerde groepen.

band te ontdekken tussen de concentratie nitriet en de voederconversie. Dezelfde conclusie geldt voor de conversie-efficiëntie van eiwit en energie.

Er trad een aanzienlijke sterfte tijdens het experiment op, die veroorzaakt werd door onderlinge agressie. Er kon geen enkele relatie gelegd worden tussen de sterfte en de nitrietconcentraties in de verschillende systemen.

Samenvattend kan gezegd worden dat langdurige blootstelling van aal aan concentraties nitriet tot 20 mg/l NO₂-N geen meetbaar negatieve effecten oplevert. In de praktijk van het palingkweken hoeft daarom met deze factor in principe geen rekening te worden gehouden. Met nadruk dient gesteld te worden dat aal in dit opzicht een uniek dier is. Voor andere vissoorten, zoals bijvoorbeeld Afrikaanse meerval (*Clarias gariepinus*), gelden deze conclusies zeker niet. Zo konden Hilmy et al. (1987) bij deze soort reeds significante effecten op het bloedbeeld vaststellen bij blootstelling gedurende 6 maanden aan concentraties van circa 3 mg/l NO₂-N.

Verder onderzoek

Als vervolg op het hierboven beschreven experiment willen we meer in het algemeen de effecten van waterrecirculatie en biologische filters op groei en voederbenutting van alen onderzoeken. De vraag, in hoeverre vissen in recirculatiesystemen minder snel en efficiënt groeien dan vissen in doorstroomsystemen en welke factoren hiervoor verantwoordelijk zijn, blijft uiteindelijk een sleutelvraag bij het kweken van vissen in recirculatiesystemen. ■

Literatuur

- Amano, H., T. Miyazaki, M. Ichioka, M. Niwa en S.S. Kubota (1981). Occurrence of nitrite-induced methemoglobinemia in cultured eels. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47(6): 823.
- Arillo, A., E. Gaino, C. Margiocco, P. Mensi en G. Schenone (1984). Biochemical and ultrastructural effects of nitrite in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Liver hypoxia as the root of the acute toxicity mechanism. Environmental Res. 34: 135-154.
- Hilmy, A.M., N.A. El-Domiatiy en K. Wershana (1987). Acute and chronic toxicity of nitrite to *Clarias lazera*. Comp. Biochem. Physiol. 86C(2):247-253.
- Kirsch, R. (1972). The kinetics of peripheral exchanges of water and electrolytes in the silver eel (*Anguilla anguilla*) in fresh water and sea water. J. Exp. Biol. 57: 489-512.
- Kubota, S.S., H. Amano, M. Ichioka, T. Miyazaki (1981). Occurrence of nitrite-induced methemoglobinemia in cultured eels (*Anguilla japonica*). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 46(6):823
- Saroglia, M.G., G. Scarano en E. Tibaldi (1981). Acute toxicity of nitrite to sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and European eel (*Anguilla anguilla*). J. World Maric. Soc. 12: 121-126.
- Tomasso, J.R. (1986). Comparative toxicity of nitrite to freshwater fishes. Aquatic Toxicology 8: 129-137.